Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

WIRKUNG EINES TEILWEISE GEREINIGTEN KALBSMILZEXTRAKTES (LYMPHOCYTENCHALON) AUF DIE ZELLPROLIFERATION IN LYMPHKNOTEN, IN DÜNNDARMEPITHELIEN UND IN EPIDERMISZELLEN, SOWIE AUF DAS BLUTBILD VON AKR-MÄUSEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HANS GANSER
aus Schopfloch

1981

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

WIRKUNG EINES TEILWEISE GEREINIGTEN KALBSMILZEXTRAKTES (LYMPHOCYTENCHALON) AUF DIE ZELLPROLIFERATION IN LYMPHKNOTEN, IN DÜNNDARMEPITHELIEN UND IN EPIDERMISZELLEN, SOWIE AUF DAS BLUTBILD VON AKR-MÄUSEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HANS GANSER
aus Schopfloch

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. G. Rassner
Berichterstatter:	Professor Dr. K. Wilms
	Priv. Doz. Dr. E. Heidemann
	(Professor Dr. H. D. Waller)

gedruckt bei Fa. H.- J. Köhler, Reprografischer Betrieb , 7400 Tübingen

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Professor Dr. Klaus Wilms und Frau Dr. Else Heidemann. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Heidemann, die mich in jeder Hinsicht bereitwillig unterstützte. Danken möchte ich auch Fräulein Nevenka Podgornik für ihre Hilfe und die gute Zusammenarbeit im Labor.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Methoden

2.1. Präparation des Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalon)

2.2. Behandlung der Mäuse

2.3. Aufarbeitung der Mäuse

2.4. Aufarbeitung der verschiedenen Organe

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der Lymphknoten

3.2. Untersuchung des Darmes

3.3. Untersuchung der Epidermis

3.4. Untersuchung der Auswirkung von Ü30 auf die Leukozytenzahl

3.5. Untersuchung der Auswirkung von Ü30 auf die Differentialblutbilder

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

Verwendete Abkürzungen

I, II	=	Versuchsbezeichnung
K1, K2	=	Bezeichnung der Kontrolltiere
Ü1, Ü2	=	Bezeichnung der Tiere, denen Ü30 injiziert wurde
MW	=	Mittelwert
TE	=	3H-Thymidineinbau
L/ul	=	Anzahl der Leukozyten/ul
3H-TdR	=	Tritium-markiertes Thymidin
Ü30	=	Fraktion, die bei der Membranfiltration entsteht, Molekulargewicht zwischen 30 000 und 50 000
cpm	=	Counts per minute (Impulse pro Minute)
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
i.p.	=	intraperitoneal
i.v.	=	intravenös

1. Einleitung

In gesundem Gewebe besteht ein Gleichgewicht zwischen Zellverlust und Zellzuwachs (25). Nach Zellverletzungen und auch Zellverlust kommt es zu steigender Zellproliferation, zu Zellwanderung und Zelldifferenzierung (14).
Als Erklärung dafür, daß es nach Zellverlust im gesunden Organismus nicht zu einer überschießenden Zellproliferation kommt, boten Weiss und Kavanau ein theoretisches Modell an, in dem sie einen Faktor postulierten, der von differenzierten Zellen gebildet wird und nach dem Prinzip der negativen Rückkoppelung die Mitoseaktivität generativer Zellen hemmt (30).
1906 hatte E.H. Starling den Ausdruck "Hormone" als Namen für stimulierende Substanzen vorgeschlagen.
E.A. Schäfer forderte einen besonderen Namen für Substanzen, die hemmend wirken und schlug das Wort "Chalon" vor. In diesem Sinne wurde der Begriff Chalon wahrscheinlich das erste Mal auf dem siebten internationalen Kongreß der Medizin benutzt (14).
Der Begriff stammt aus dem Griechischen, wo er bedeutet, die Segel streichen, langsamer fahren.
1960 stellten Bullough und Laurence fest, daß wässrige Extrakte aus Epidermis die Mitose von Epidermiszellen, nicht jedoch von Zellen anderer Gewebe, hemmen (6).
Im Jahre 1962 übernahm dann Bullough das Wort Chalon für diese gewebespezifischen Mitosehemmstoffe.
Die Epidermischalone waren lange Zeit das Hauptobjekt der Chalonforschung (14).
In den letzten Jahren wurden jedoch weitere Untersuchungen zum Nachweis von Chalonen in anderen Geweben durchgeführt.

Chalone sind in den Geweben zu finden, in denen sie produziert werden und auf die sie selektiv wirken. Sie können

lokal durch Diffusion, oder im ganzen Körper nach Verteilung durch das Blut wirken. Es handelt sich um wasserlösliche Moleküle, die gewebespezifisch, aber nicht speziesspezifisch sind.
Ihre Wirkung ist reversibel und nicht toxisch. Außerdem ist sie nur von kurzer Dauer. Dies kann die Folge des Vorhandenseins von Chalonantagonisten, manchmal "Antichalone" genannt, sein.
Der Mechanismus der Chalonwirkung ist noch nicht bekannt. Es ist nicht einmal bekannt, ob sie innerhalb der Zellen oder über die Zellmembran wirken (14).

Moorhead et al. (21) und Jones et al. (17) erweiterten das Chalonkonzept auf das lymphatische System. Moorhead et al. konnten zeigen, daß Extrakte von Lymphknoten des Schweines die morphologisch demonstrierbare Transformation von PHA-stimulierten menschlichen Lymphozyten und die Inkorporation von 3H-TdR in die DNS dieser Zellen hemmen.
Garcia-Giralt et al. beschrieben die Extraktion eines Lymphozytenhemmstoffes aus der Milz (11).
Auch Heidemann et al. konnten zeigen, daß wässriger Extrakt aus Kalbsmilz den Thymidineinbau in lymphoide Zellen (MKT-CH) und PHA-stimulierte Lymphozytenkulturen hemmt. Zellen nicht lymphatischen Gewebes (Melanomzellen Mel Ei 78 und Ehrlich-Ascites-Zellen), wurden nicht beeinflußt (12).

In der vorliegenden Arbeit sollte ein wässriger Kalbsmilzextrakt, der nach dem Verfahren von E. Heidemann et al. gewonnen wurde, in vivo untersucht werden. Als Ergänzung zu den Untersuchungen von Wörz (33), die eine Proliferationshemmung im Thymus zeigten, wurde die Wirkung auf die Zellproliferation in den inguinalen und paraaortalen Lymphknoten, auf die Proliferation der Epithelzellen des Dünndarms und der Epidermis, sowie auf das Blutbild von

AKR-Mäusen untersucht.
Bei den Versuchstieren handelte es sich um ca. 6 - 8 Wochen alte Tiere, denen Thymuszellen einer AKR-Maus mit manifester lymphatischer Leukämie i.v. injiziert worden waren. AKR-Mäuse erkranken spontan an Lymphomen mit leukämischer Verlaufsform. Im Alter von 6 - 8 Wochen konnte sich noch kein Lymphom entwickelt haben (29). Wir wählten die transplantierte AKR-Leukämie als Modell zur Testung unseres Inhibitors, da die Leukämiezellen in ihrem Proliferationsverhalten hier standardisiert sind.

2. Methoden

2.1. Präparation des Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalon)

Kalbsmilz von ungefähr 10 Wochen alten Kälbern wurde sofort nach der Schlachtung in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt und anschließend im Waring Blendor homogenisiert. Durch Zusatz von Trockeneis wurde die Temperatur auf 6° C gehalten. Das Homogenat wurde durch einen Mullstrumpf gedrückt, so konnten die bindegewebigen Anteile zurückgehalten werden.
Von einer Milz erhielt man etwa 400 ml Homogenat, das mit Azeton p.a. von 6° C auf 1000 ml aufgefüllt wurde. Während man das Azeton in kleinen Portionen zugab, wurde mit dem Thermometer gerührt und, wenn nötig, Trockeneis zugefügt. Der Azetonbrei wurde 1 Stunde lang gerührt und dann bei 1050 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment im halben Volumen Azeton aufgerührt und noch einmal 15 Minuten lang zentrifugiert (Waschen).
Das Sediment wurde sodann für ca. 16 Stunden in 1000 ml Aqua bidest. gerührt (wässrige Extraktion), und danach 80 Minuten bei 15000 RPM (im Mittel 22500 g) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Amiconzelle durch eine XM 50-Membran filtriert und das Filtrat auf eine PM 30-Membran gegeben. Die Fraktion zwischen den beiden Membranen (nominales Molekulargewicht von 30000 bis 50000) wurde weiterverarbeitet (12,15,16). Sie wird ab hier $Ü_{30}$ genannt (= Überstand der PM 30-Membran). Das $Ü_{30}$ wurde in Dialyseschläuche abgefüllt und gegen mindestens die 200-fache Mange aqua dest. ca. 48 Stunden lang dialysiert.
Nach Beendigung der Dialyse wurde die Flüssigkeit in vorgekühlte Lyophilisiergläser abgefüllt und lyophilisiert

(12,19).
Das Lyophilisat wurde abgenommen, gewogen und in Szintillatorröhrchen verpackt, diese luftdicht verschlossen und in der Gefriertruhe bei - 20° C gelagert. Die gewebespezifische Hemmung des Thymidineinbaus war auch nach sechsmonatiger Aufbewahrung des Extrakts im lyophilisierten Zustand bei - 20° C noch nachzuweisen, wie durch frühere Versuche in unserem Labor gezeigt wurde (12).

2.2. Behandlung der Mäuse

AKR-Mäuse wurden, ca 4 Wochen alt, von der Firma Bomholtgard aus Dänemark bezogen und mit ca. 6-8 Wochen, nachdem sie sich akklimatisiert hatten, zum Versuch verwendet (3, 28,31).
Es wurden 4 Versuche mit insgesamt 53 Tieren durchgeführt. Davon wurden 20 als Kontrolltiere verwendet.
Allen Tieren wurden 1-2x10^6 Zellen vom Thymus einer AKR-Maus mit manifester lymphatischer Leukämie i.v. injiziert (3,4,28).
Als Spendermäuse wurden Tiere ausgewählt, die eine Vergrößerung des Thymus, und/oder der inguinalen Lymphknoten zeigten (18,26,29).
Die kranke Maus, deren Thymuszellen den Versuchstieren injiziert werden sollten, wurde in Äther getötet. Anschließend wurde sofort ein T-förmiger Bauchschnitt angelegt, die Bauchdecke, sowie das Zwerchfell auf beiden Seiten vom Rippenbogen abgetrennt und das Sternum längs gespalten, so daß die Thoraxseiten nach außen geklappt werden konnten. Nun wurde der Thymus unter sterilen Kautelen herausgenommen, auf einem Zellsieb mit einer kleinen Schere möglichst fein zerschnitten und die Zellen mit 20 ml physiologischer NaCl, bei Versuch III und IV mit 20 ml RPMI-1640- Kulturmedium (Microbiological Ass., Walkersville,

Maryland, USA) durch das Zellsieb in ein Becherglas gespült. Die Zellzahl wurde in der Neubauerkammer ermittelt. Die Thymuszellsuspension wurde auf 1-2x 10^6 (3,4,28) Zellen pro 0,2 ml eingestellt und zur Injektion verwendet. Zum Spritzen wurden die Mäuse in einen Haltekäfig gebracht. Es wurden 10^6 Zellen, und bei Versuch V, $2x10^6$ Zellen in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung, in die Schwanzvene (3,4,28) injiziert.
Nach dem Spritzen wurden die Mäuse in desinfizierte Käfige mit frischer Streu zurückgesetzt, wobei die Gruppen unverändert blieben.
Nach dem Wiegen und Kennzeichnen der Mäuse wurde ein Teil von ihnen der Gruppe der Kontrollmäuse, und der andere Teil der Gruppe der mit $Ü_{30}$ zu behandelnden Mäuse zugeordnet. Die Zuordnung erfolgte in der Weise, daß sich die Gruppen vom Gewicht der Versuchstiere her möglichst glichen. Die Mäuse wurden jedoch wieder in den gleichen Gruppen zusammengesetzt, in denen sie vor dem Wiegen und Kennzeichnen auch waren, damit sich keine neue soziale Rangordnung ergab, die zu Stress hätte führen können.

Etwa 48 Stunden nach der Inokulation der Thymuszellen wurden $Ü_{30}$ und 3H-TdR injiziert (3).
Die benötigte Menge $Ü_{30}$ wurde sterilfiltriert (Millipore-Filter, Fa. Millipore, Buc, Frankreich, Porengröße 0,22 um), und bis zur Injektion im Kühlschrank aufbewahrt.
Der in physiologischer Kochsalzlösung gelöste und sterilfiltrierte Milzextrakt $Ü_{30}$, wurde den Mäusen in die Schwanzvene (3,4,28) injiziert.
17 Tieren wurden je 0,5 mg $Ü_{30}$, und je 8 Tieren 1,0 und 2,0 mg $Ü_{30}$ pro Maus i.v. injiziert.
Jede Maus erhielt 0,2 ml injiziert, in denen die entsprechende Menge $Ü_{30}$ gelöst war. Die Kontrollmäuse erhielten dasselbe Volumen physiologischer Kochsalzlösung (7,10) ohne $Ü_{30}$ verabreicht.

Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die Zellen diente als Maß für die DNS-Synthese und damit indirekt für die Zellteilung (14,22,24,27).
Das Thymidin (6-3H-Thymidin wässrige Lösung, spezifische Aktivität 2 Ci/mmol, Amersham, Braunschweig) wurde i.p. injiziert. Jede Maus erhielt 120 µCi 3H-TdR in 0,24 ml physiologischer Kochsalzlösung gleichzeitig mit dem Kalbsmilzextrakt (20,23,27).

2.3. Aufarbeitung der Mäuse

Die Mäuse wurden ca. 24 Stunden nach der Injektion von $Ü_{30}$ und 3H-TdR aufgearbeitet (12,13).
Bei Versuch II, III und IV wurde den Mäusen mit einem Scherenschlag die Schwanzspitze gekappt und Blut für die Bestimmung der Leukozyten und zur Anfertigung der Differentialblutbilder entnommen. Die Leukozyten wurden in der Neubauerkammer ausgezählt. Je Ausstrich wurden 100 Zellen differenziert. Von 2 Versuchstieren konnte kein Ausstrich und von 4 nur jeweils einer differenziert werden.
Zur Entnahme der Lymphknoten, des Dünndarms und der Epidermisproben wurde die Maus mit Äther getötet.
Nach Eröffnung der Bauchdecken wurden zuerst die Ln. inguinales superficiales entnommen.
Die beiden Lymphknoten, je einer von der linken und rechten Seite, wurden in ein kleines Plastikgefäß verpackt

Danach wurde das Peritoneum eröffnet, die Därme wurden mit der Pinzette zur Seite gedrängt, die paraaortalen Lymphknoten wurden herausgenommen und ebenfalls in ein vorher gekennzeichnetes Plastikgefäß verstaut. Die Lymphknoten wurden bei - 20^{O} C eingefroren und erst zu einem späteren Zeitpunkt weiter verarbeitet.

Bei den Tieren der Versuche II, III und IV wurde auch das Jejunum und das Ileum herausgenommen.
Bei der Entnahme des Dünndarmes hielt man den Darm mit einer kleinen anatomischen Pinzette fest und durchtrennte ihn mit einer Schere am Magenausgang und am Colon. Das Mesenterium wurde möglichst nahe am Darm von diesem abgestreift. Nachdem der Darm herausgenommen worden war, schnitten wir das terminale 5 cm lange Stück, das etwa dem Ileum entsprach, ab und behandelten es gesondert weiter. Zur Reinigung wurde der Darm mit 10 oder 20 ml physiologischer Kochsalzlösung durchgespült. Er wurde in Plastikgefäßen verpackt, gewogen und bei - 20° C eingefroren.

Zum Nachweis der Gewebespezifität wurde bei 35 Versuchstieren, und zwar denjenigen von Versuch III und IV, neben der Wirkung auf das Jejunum auch diejenige auf die Epidermis untersucht.
Wir entnahmen von jeder Bauchseite ein gleich großes Stück, dessen Umriß mit einem Stempel markiert wurde. Mit einem Einmalrasierapparat wurden die Haare entfernt. Wenn das Hautstück abgetrennt war, wurde das Unterhautfettgewebe mit Einmallanzetten möglichst vollständig entfernt. Nach dem Wiegen wurden die Proben in Plastikgefäßen eingefroren.

2.4. Aufarbeitung der verschiedenen Organe

Nach dem Auftauen wurden die Lymphknoten in Szintillatorröhrchen gegeben (1 Röhrchen pro Lymphknotengruppe eines Tieres), je 2 ml Lösungsvermittler (Soluene New England Nuclear, Dreieichenhain /Frankfurt, Main) dazupipettiert und mit einer Schere zerkleinert.
Die Röhrchen wurden dann mit dem Heidolph-Rüttler geschüttelt um eine gute Durchmischung von Soluene und Gewebestückchen zu erreichen, und damit die Digestion zu beschleunigen. Da Soluene bei 37° C das Wirkungsoptimum hat, wurden die Szintillatorröhrchen anschließend in einen Inkubator, oder in ein Wasserbad mit dieser Temperatur gestellt, bis die Gewebestückchen gelöst waren. Bevor sie dann im Liquid Szintillation Counter gemessen werden konnten, mußten noch 15 ml, 0,4%iger Omnifluor^{R}-Toluol-Scintillator (New England Nuclear, Dreieichenhain/ Frankfurt, Main) dazugegeben und die Röhrchen noch einmal kräftig geschüttelt werden.

Nach Auftauen der Dünndarmprobe gab man sie in beschriftete Szintillatorröhrchen. In die Röhrchen, die das Ileum enthielten, wurden 2 ml, in die, die das Jejunum enthielten, wegen der größeren Gewebemenge, 4 ml Soluene pipettiert. Dann wurden die Darmstücke mit einer Schere zerkleinert. Die Röhrchen wurden verschlossen, mit dem Heidolph-Rüttler geschüttelt und in ein 37° C warmes Wasserbad, oder einen Brutschrank mit derselben Temperatur gestellt, bis das Gewebe aufgelöst war.
Dann wurden 15 ml Szintillator dazupipettiert, gut geschüttelt und aus den Röhrchen, die das Jejunum enthielten, jeweils 2 Proben hergestellt. Dazu wurden je 0,5 ml entnommen und zu diesen jeweils 10 ml Szintillator dazupipettiert. Aus den Röhrchen, die das Ileum enthielten, wurde nur 1 Probe hergestellt und zwar wurde dazu 1 ml

entnommen, und ebenfalls 10 ml Szintillator zugegeben. Die Verdünnung wurde vorgenommen, um im Bereich um 100 000 cpm messen zu können, da die Messung in höheren Bereichen nicht mehr linear ist.

Die Cutisproben wurden nach dem Auftauen in je 2 ml Soluene gelöst. Zu der Lösung gab man 15 ml Szintillator, schüttelte sie und bestimmte anschließend die Aktivität. Die Impulse wurden auf das Gewicht der Probe bezogen (=cpm/100mg).

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte durch den verteilungsfreien Rangtest von Wilcoxon (32).

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der Lymphknoten

Der teilweise gereinigte Kalbsmilzextrakt $Ü_{30}$ hemmte den Thymidineinbau in die inguinalen und paraaortalen Lymphknoten in keiner der eingesetzten Konzentrationen signifikant, wie aus Tabelle 1 und 2, sowie Abbildung 1 und 2 zu ersehen ist.

	Kontrollen cpm		0,5 mg Ü30 cpm	1,0 mg Ü 30 cpm	2,0 mg Ü 30 cpm
I	K1	29549	Ü1 43076		
	K2	50619	Ü2 50957		
	K3	46873	Ü3 35259		
	K4	44258	Ü4 47029		
	MW	42825	44080		
	=100% TE		=102,9% TE		
II	K1	51915	Ü1 23238		
	K2	48802	Ü2 34297		
	K3	57076	Ü3 47330		
	K4	23918	Ü4 33571		
	K5	26781	Ü5 33688		
	MW	41698	34425		
	=100% TE		= 82,6% TE		
III	K1	36638	Ü1 45970	17843	31185
	K2	31324	Ü2 17032	25129	15059
	K3	62622	Ü3 32339	31610	21617
	K4	48299	Ü4 49183	25273	53469
	K5	34077			
	K6	23317			
	MW	39380	36131	24964	30333
	=100% TE		= 91,8% TE	=63,4% TE	=77,0% TE
IV	K1	20070	Ü1 14846	14325	24579
	K2	12356	Ü2 14054	20779	9716
	K3	22052	Ü3 35737	28548	22189
	K4	31709	Ü4 22381	22544	30631
	K5	23492			
	MW	21936	21755	21549	21779
	=100% TE		= 99,2% TE	=98,2% TE	=99,3% TE

Tabelle 1: 3H-Thymidineinbau in die inguinalen Lymphknoten

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
I-IV = Versuchsnummer
1-6 = Nummer des Tieres
MW = Mittelwert des 3H-Thymidineinbaus der Tiere eines Versuches
cpm = Impulse pro Minute
TE = 3H-Thymidineinbau in % der Kontrollen

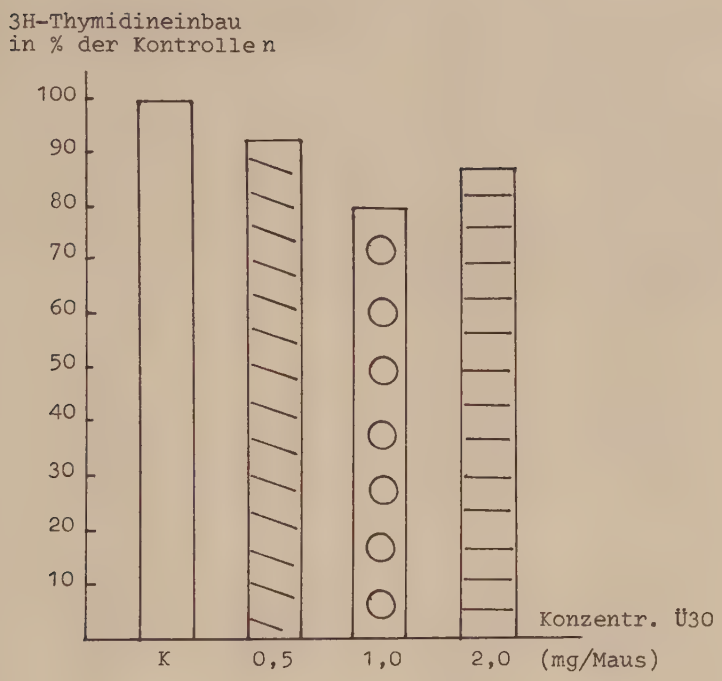

Abb. 1: 3H-Thymidineinbau in die inguinalen Lymphknoten unter der Einwirkung von Ü 30 (Mittelwerte sämtlicher Versuche). Die Hemmung ist nicht signifikant.

K = Kontrollen (n=20)

0,5 = 0,5 mg Ü 30/Maus (n=17)

1,0 = 1,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

2,0 = 2,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

	Kontrollen cpm	0,5 mg Ü30 cpm	1,0 mg Ü30 cpm	2,0 mg Ü30 cpm
I	K1 58872	Ü1 46525		
	K2 27280	Ü2 66791		
	K3 72466	Ü3 27128		
	K4 86089	Ü4 70277		
	MW 61177	52680		
	=100% TE	= 86,1% TE		
II	K1 39356	Ü1 56136		
	K2 46700	Ü2 43630		
	K3 36275	Ü3 40789		
	K4 51411	Ü4 55855		
	K5 82619	Ü5 65626		
	MW 51272	52407		
	=100% TE	=102,2% TE		
III	K1 79084	Ü1 35108	39741	32028
	K2 34477	Ü2 53473	56908	56872
	K3 42831	Ü3 50900	41278	63837
	K4 35171	Ü4 49475	54406	47715
	K5 59960			
	K6 68821			
	MW 53391	47239	48083	50113
	=100% TE	= 88,5% TE	=90,1% TE	=93,9% TE
IV	K1 34123	Ü1 39940	55719	32027
	K2 43793	Ü2 39117	44827	26070
	K3 34524	Ü3 47919	35240	45105
	K4 51361	Ü4 23561	20852	27091
	MW 40831	37634	39160	32573
	=100% TE	= 92,2% TE	=95,9% TE	=79,8% TE

Tabelle 2: 3H-Thymidineinbau in die paraaortalen Lymphknoten

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
I-IV = Versuchsnummer
1-6 = Nummer des Tieres
MW = Mittelwert des 3H-Thymidineinbaus der Tiere eines Versuches
cpm = Impulse pro Minute
TE = 3H-Thymidineinbau in % der Kontrollen

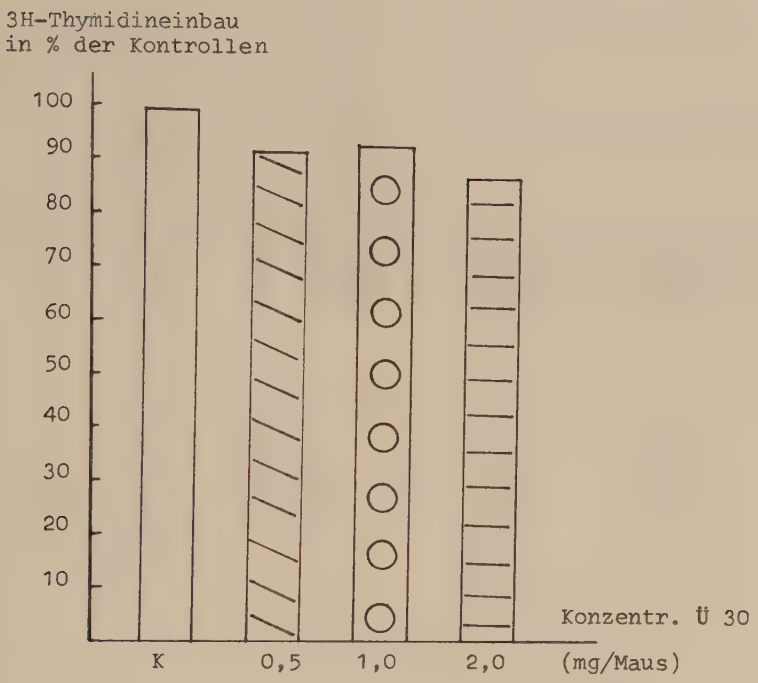

Abb. 2: 3H-Thymidineinbau in die paraaortalen Lymphknoten unter Einwirkung von Ü 30 (Mittelwerte sämtlicher Versuche). Die Hemmung ist nicht signifikant.

K = Kontrollen (n=20)

0,5 = 0,5 mg Ü 30/Maus (n=17)

1,0 = 1,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

2,0 = 2,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

3.2. Untersuchung des Darmes

Bei der Unt ersuchung des Jejunums war keine signifikante Hemmung des 3H-TdR-Einbaus festzustellen, wie Tabelle 3 und Abbildung 3 zu entnehmen ist.

	Kontrollen cpm	0,5 mg Ü30 cpm	1,0 mg Ü30 cpm	2,0 mg Ü30 cpm
II	K1 92732	Ü1 105196		
	K2 93192	Ü2 83342		
	K3 92400	Ü3 91307		
	K4 48650	Ü4 103025		
	K5 101114	Ü5 60133		
	MW 85618	88597		
	=100% TE	=103,5% TE		
III	K1 103210	Ü1 114893	94898	78311
	K2 98834	Ü2 99977	110109	82355
	K3 86441	Ü3 97906	92704	96366
	K4 104093	Ü4 71477	83388	77409
	K5 75345			
	K6 107045			
	MW 95828	96063	95275	83610
	=100% TE	=100,2% TE	=99,4% TE	=87,3% TE
IV	K1 89653	Ü1 Werte	86822	167887
	K2 93129	Ü2 nicht	94107	116217
	K3 120177	Ü3 brauch-	76684	126489
	K4 109008	Ü4 bar	84612	150096
	MW 102532		85556	140172
	=100% TE		=83,4% TE	=136,7% TE

Tabelle 3: 3H-Thymidineinbau in das Jejunum

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
II-IV = Versuchsnummer
1-6 = Nummer des Tieres
MW = Mittelwert des 3H-Thymidineinbaus der Tiere eines Versuches
cpm = Impulse pro Minute
TE = 3H-Thymidineinbau in % der Kontrollen

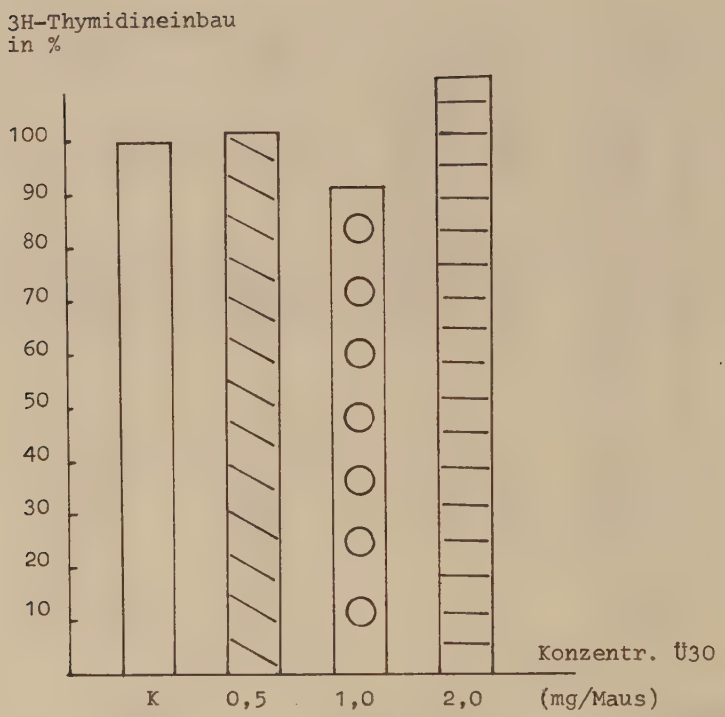

Abb. 3: 3H-Thymidineinbau in das Jejunum unter der Einwirkung von Ü 30 (Mittelwerte sämtlicher Versuche). Die Hemmung ist nicht signifikant.

K = Kontrollen

0,5 = 0,5 mg Ü 30/Maus (n=9)

1,0 = 1,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

2,0 = 2,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

	Kontrollen cpm	0,5 mg Ü30 cpm	1,0 mg Ü30 cpm	2,0 mg Ü30 cpm
II	K1 117144	Ü1 120667		
	K2 79323	Ü2 101741		
	K3 96985	Ü3 80702		
	K4 52788	Ü4 93606		
	K5 85464	Ü5 99280		
	MW 86341 =100% TE	99199 =114,9% TE		
III	K1 84782	Ü1 79754	91240	93946
	K2 71132	Ü2 80751	90994	81423
	K3 65192	Ü3 76284	84878	92140
	K4 90554	Ü4 90138	56568	73622
	K5			
	K6			
	MW 79499 =100% TE	81732 =102,8% TE	80920 =101,8% TE	85283 =107,3% TE
IV	K1 83559	Ü1 61973	46968	93820
	K2 63042	Ü2 67879	84294	50043
	K3 96529	Ü3 79137	80593	67454
	K4 96532	Ü4 70868	63127	86063
	K5 101183			
	MW 88169 =100% TE	69964 = 79,3% TE	68746 = 77,9% TE	74345 = 84,3% TE

Tabelle 4: 3H-Thymidineinbau in das Ileum

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
II-IV = Versuchsnummer
1-6 = Nummer des Tieres
MW = Mittelwert des 3H-Thymidineinbaus der Tiere eines Versuches
cpm = Impulse pro Minute
TE = 3H-Thymidineinbau in % der Kontrollen

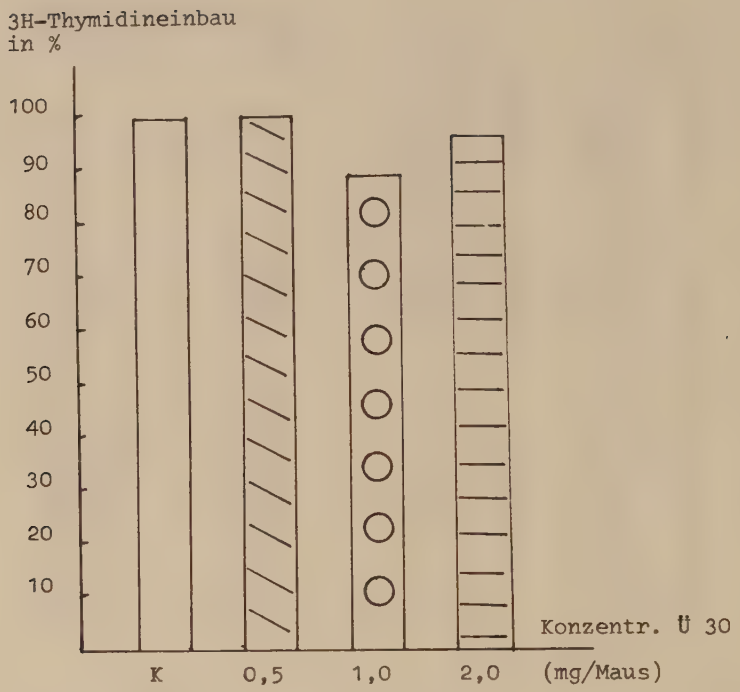

Abb. 4: 3H-Thymidineinbau in das Ileum unter der Einwirkung von Ü 30 (Mittelwerte sämtlicher Versuche). Die Hemmung ist nicht signifikant.

K = Kontrollen (n=16)

0,5 = 0,5 mg Ü 30/Maus (n=13)

1,0 = 1,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

2,0 = 2,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

3.3. Untersuchung der Epidermis

In Tab. 5 und 6 sind die Impulse der beiden Cutisproben je Versuchstier, sowie das Gewicht der Proben in mg und zusätzlich die Impulse pro Gewichtseinheit aufgeführt. Es findet sich keine signifikante Hemmung des 3H-TdR-Einbaus in die Epidermis nach Injektion von Ü30 (Tab. 5 und 6, Abb. 5).

		Probe Nr. I			Probe Nr. II		
		cpm	mg	$\frac{cpm}{100mg}$	cpm	mg	$\frac{cpm}{100mg}$
III	K1	73731	157	46962	-	-	-
	K2	100060	108	92648	101591	95	106938
	K3	115634	104	111186	72862	77	94626
	K4	89289	96	93009	111266	93	119641
	K5	71058	79	89947	80623	94	85769
	K6	97692	89	109766	135688	107	126811
	MW	91244		90586 =100%TE	100406		106757 =100%TE
	0,5mg						
	Ü1	97428	110	88571	-	-	-
	Ü2	103162	124	83195	91379	98	93244
	Ü3	101801	114	89299	128257	137	93618
	Ü4	107698	131	82212	116324	130	89480
	MW	102522		85819 =94,7%TE	111987		92114 =86,3%TE
	1,0mg						
	Ü1	137425	128	107363	128799	117	110085
	Ü2	114383	114	100336	96167	87	110537
	Ü3	74955	91	82368	87746	89	98591
	Ü4	132926	129	103043	149550	132	113295
	MW	114922		98278 =108,5%TE			108127 =101,3%TE
	2,0mg						
	Ü1	127754	122	104716	117912	119	99086
	Ü2	95476	93	102662	84839	84	100999
	Ü3	144245	150	96163	122931	129	95281
	Ü4	67541	77	87716	54781	74	74028
	MW	108754		97814 =108,0%TE			92349 =86,5%TE

Tabelle 5: 3H-Thymidineinbau in die Epidermis

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
III = Versuchsnummer
1-6 = Nummer des Tieres
MW = Mittelwert des 3H-Thymidineinbaus der Tiere eines Versuches
cpm = Impulse pro Minute
TE = 3H-Thymidineinbau in % der Kontrollen

		Probe Nr. I cpm	mg	cpm/100mg	Probe Nr. II cpm	mg	cpm/100mg
IV	K1	83146	80	103933	70190	80	87738
	K2	56783	61	93087	125510	109,6	114516
	K3	102436	79,6	128688	98244	85,6	114748
	K4	127119	105,9	120037	80110	145,6	55021
	K5	97311	74	131501	71492	66	108321
	MW	93359		115449 =100%TE	89105		96069 =100%TE
	0,5mg						
	Ü1	148395	116,1	127817	41822	51,2	81684
	Ü2	82143	82,4	99688	73872	73,4	100643
	Ü3	135996	109,0	124767	139653	125,1	111633
	Ü4	68373	112,0	61047	74827	110,0	68025
	MW	108727		103330 =89,5%TE			90496 =94,2%TE
	1,0mg						
	Ü1	47443	59,3	80005	25909	46,8	55361
	Ü2	72469	61,7	117454	80648	74,0	108984
	Ü3	56306	80,1	70295	39761	66,3	59971
	Ü4	43669	79,5	54930	108927	116,6	93419
	MW	54972		80671 =68,9%TE			79434 =82,7%TE
	2,0mg						
	Ü1	73075	72,6	100654	75247	94,9	79291
	Ü2	68387	61,3	111561	75114	82,0	91602
	Ü3	92617	91,0	101777	82401	61,0	135084
	Ü4	114021	103,4	110272	123656	139,8	88452
	MW			106066 =91,9%TE			98607 =102,6%TE

Tabelle 6: 3H-Thymidineinbau in die Epidermis

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
IV = Versuchsnummer
1-5 = Nummer des Tieres
MW = Mittelwert des 3H-Thymidineinbaus der Tiere eines Versuches
cpm = Impulse pro Minute
TE = 3H-Thymidineinbau in % der Kontrollen

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte der Impulse pro 100 mg der Epidermisproben I und II, sowie die Mittelwerte des Thymidineinbaus in % aus Versuch III und IV aufgeführt.
Es ist keine signifikante Hemmung des Thymidineinbaus festzustellen (Tab. 7 und Abb. 5).

	Kontrollen		0,5		1,0		2,0	
	cpm/100mg	%TE	cpm/100mg	%TE	cpm/100mg	%TE	cpm/100mg	%TE
III	97936	100	88517	90,4	103203	105,4	95082	97,1
IV	105759	100	96913	91,6	80053	75,7	102337	96,8
MW				91,0		90,6		97,0

Tabelle 7: 3H-Thymidineinbau in die Epidermis

III-IV = Versuchsnummer
MW = Mittelwert des 3H-Thymidineinbaus der Tiere von Versuch III und IV
cpm = Impulse pro Minute
TE = 3H-Thymidineinbau in % der Kontrollen
0,5 = 0,5 mg Ü30 pro Maus
1,0 = 1,0 mg Ü30 pro Maus
2,0 = 2,0 mg Ü30 pro Maus

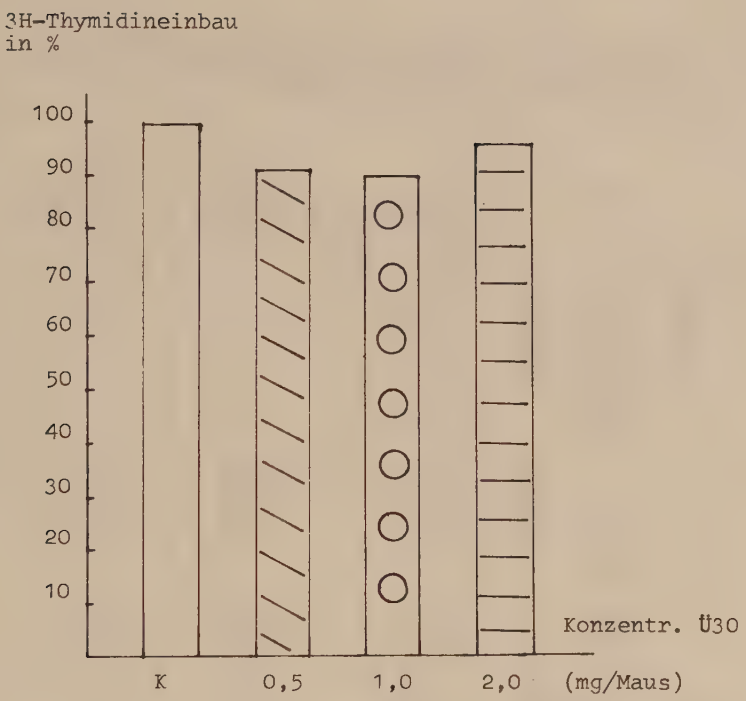

Abb.5: Thymidineinbau in die Epidermis unter der Einwirkung von Ü 30 (Mittelwerte sämtlicher Versuche). Die Hemmung ist nicht signifikant.

K = Kontrollen (n=11)

0,5 = 0,5 mg Ü 30/Maus (n=8)

1,0 = 1,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

2,0 = 2,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

3.4. Untersuchung der Auswirkung von Ü30 auf die Leukozytenzahl im Blut der Mäuse

		L/ul		L/ul 0,5mg Ü30	L/ul 1,0mg Ü30	L/ul 2,0mg Ü30
II	K1	10750	Ü1	6800		
	K2	5650	Ü2	-		
	K3	3500	Ü3	2750		
	K4	10700	Ü4	6000		
	K5	3350	Ü5	5550		
	MW	6790 =100%		5275 =77,5%		
III	K1	-	Ü1	9974	12261	11346
	K2	13817	Ü2	17843	8784	14366
	K3	8693	Ü3	15281	8610	10523
	K4	17660	Ü4	9425	7503	5856
	K5	15464				
	K6	14091				
	MW	13945 =100%		13131 =94,2%	9265 =66,4%	10523 =75,5%
IV	K1	8746	Ü1	11079	11912	8746
	K2	9246	Ü2	9996	8830	12078
	K3	6664	Ü3	Blut geronnen	5831	15910
	K4	5831	Ü4	-	11578	-
	K5	6914				
	MW	7480 =100%		10538 =140,9%	9538 =127,5%	12245 =163,7%

Tabelle 8: Leukozytenzählung

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
II-IV = Versuchsnummer
1-6 = Nummer des Tieres
MW = Mittelwert der Leukozytenzahl der Tiere eines Versuches
L/ul = Leukozyten pro ul

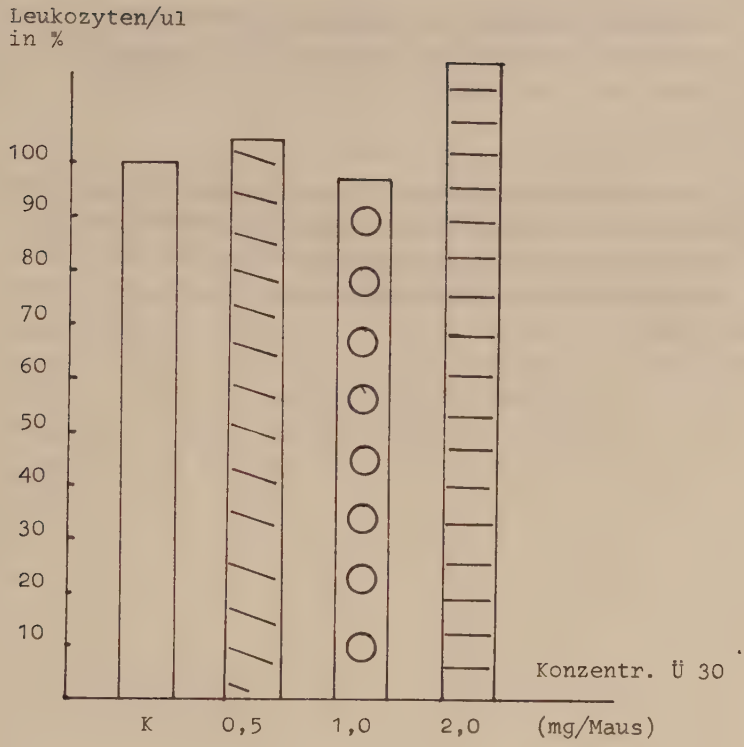

Abb. 6: Leukozytenzählung (Mittelwerte der Versuche II-IV)

K = Kontrollen (n=15)

0,5 = 0,5 mg Ü 30/Maus (n=10)

1,0 = 1,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

2,0 = 2,0 mg Ü 30/Maus (n=7)

Die Leukozytengesamtzahl der Mäuse wurde durch den teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt nicht signifikant beeinflußt, wie Tab. 8 und Abb. 6 zu entnehmen ist.

Bei 2 Versuchsgruppen konnte aus technischen Gründen nicht bei allen Tieren Venenblut gewonnen werden, so daß hier eine statistische Auswertung nicht möglich war. Die Ergebnisse der übrigen Gruppen waren nicht signifikant.

3.5. Untersuchung der Auswirkung von Ü30 auf die Differentialblutbilder

In Tabelle 14 ist der Mittelwert der Lymphozyten, Kernschatten, Granulozyten und Monozyten sämtlicher Versuchsgruppen aufgeführt. In Tabelle 15 findet sich die Verteilung der Zellen auf die lymphatische und die nicht lymphatische Reihe. Es zeigt sich eine geringe konzentrationsabhängige, nicht signifikante Hemmung der lymphatischen Reihe (Lymphozyten und Kernschatten), und parallel dazu ein konzentrationsabhängiges nicht signifikantes Ansteigen der nicht lymphatischen Reihe (Granulozyten und Monozyten, Tab. 15 und Abb. 7).

Kontrollen									0,5 mg Ü 30								
Einzelwerte Ka, Kb					MW von Ka + Kb				Einzelwerte Üa, Üb					MW von Üa + Üb			
	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M		L	Ke	G	M	L	Ke	G	M
K1a	82	0	17	1	78	0,5	20,5	1	Ü1a	81	3	14	2	81	3	14	2
K1b	74	1	24	1					Ü1b	–	–	–	–				
K2a	84	0	15	1	86	0	13,5	0,5	Ü2a	91	0	9	0	86	3	10,5	0,5
K2b	88	0	12	0					Ü2b	81	6	12	1				
K3a	83	3	14	0	78,5	1,5	18,5	1,5	Ü3a	86	2	12	0	88,5	1	10,5	0
K3b	74	0	23	3					Ü3b	91	0	9	0				
K4a	63	8	24	5	49,5	7	38,5	5	Ü4a	74	2	21	3	79	2,5	17	1,5
K4b	36	6	53	5					Ü4b	84	3	13	0				
									Ü5a	88	1	10	1	90,5	1	7	1,5
									Ü5b	93	1	4	2				
MW					73	2,25	22,75	2,0	MW					85,0	2,1	11,8	1,1

Tabelle 9: Differentialblutbilder der einzelnen Mäuse Versuch II

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
1–5 = Nummer des Tieres
a = Differentialblutbild a
b = Differentialblutbild b
MW = Mittelwert aus den Differentialblutbildern a + b, bzw. aus den Differentialblutbildern aller Tiere des Versuchs II

L = Lymphozyten
Ke = Kernschatten
G = Granulozyten
M = Monozyten

Kontrollen

Einzelwerte Ka, Kb	L	Ke	G	M	MW von Ka + Kb L	Ke	G	M
K1a	–	–	–	–	–	–	–	–
K1b	–	–	–	–				
K2a	78	4	16	2	83,5	2	13,5	1
K2b	89	0	11	0				
K3a	77	8	15	0	73,5	6,5	20,0	0
K3b	70	5	25	0				
K4a	87	1	11	1	83,5	3	12	1,5
K4b	80	5	13	2				
K5a	81	4	15	0	79	4	17	0
K5b	77	4	19	0				
K6a	94	0	6	0	94	0	6	0
K6b	nicht auszählbar							
MW					82,7	3,1	13,7	0,5

0,5 mg Ü 30

Einzelwerte Üa, Üb	L	Ke	G	M	MW von Üa + Üb L	Ke	G	M
Ü1a	72	2	22	4	72	2	22	4
Ü1b	–	–	–	–				
Ü2a	78	2	17	3	70	1	25,5	3,5
Ü2b	62	0	34	4				
Ü3a	69	7	18	6	66,5	6,5	21,5	5,5
Ü3b	64	6	25	5				
Ü4a	78	1	17	4	80	0,5	16	3,5
Ü4b	82	0	15	3				
MW					72,125	2,5	21,25	4,125

Tabelle 10: Differentialblutbilder der einzelnen Mäuse Versuch III

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt behandelt wurden
1-6 = Nummer des Tieres
a = Differentialblutbild a
b = Differentialblutbild b

MW = Mittelwert aus den Differentialblutbildern a + b, bzw. aus den Differentialblutbildern aller Tiere des Versuchs III
L = Lymphozyten
Ke = Kernschatten
G = Granulozyten
M = Monozyten

	1,0 mg Ü 30								2,0 mg Ü 30							
	Einzelwerte Üa Üb				MW von Üa+Üb				Einzelwerte Üa Üb				MW von Üa+Üb			
	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M
Ü1a	58	7	26	9	63,5	6	22	8,5	70	4	19	7	74	3,5	17	5,5
Ü1b	69	5	18	8					78	3	15	4				
Ü2a	68	1	22	8	68	2	21,5	8,5	70	0	27	3	66,5	3,5	27	3
Ü2b	67	3	21	9					63	7	27	3				
Ü3a	86	3	7	4	84	1,5	10	4,5	72	8	14	6	72	8	14	6
Ü3b	82	0	13	5					–	–	–	–				
Ü4a	80	1	15	4	80	1	15	4	79	2	17	2	71	2	23,5	3,5
Ü4b	nicht auszählbar Farbniederschläge								63	2	30	5				
MW					73,9	2,6	17,1	6,4					70,875	4,25	20,375	4,5

Tabelle 11: Differentialblutbilder der einzelnen Mäuse Versuch III

Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
1-4 = Nummer des Tieres
a = Differentialblutbild a
b = Differentialblutbild b
MW = Mittelwert aus den Differentialblutbildern a + b, bzw. aus den Differentialblutbildern aller Tiere des Versuchs III

L = Lymphozyten
Ke = Kernschatten
G = Granulozyten
M = Monozyten

Kontrollen

Einzelwerte Ka, Kb					MW von Ka + Kb			
	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M
K1a	73	0	22	5	70	0,5	25,5	4
K1b	67	1	29	3				
K2a	66	0	27	7	69	0,5	25	5,5
K2b	72	1	23	4				
K3a	72	1	27	0	75	1	21,5	2,5
K3b	78	1	16	5				
K4a	82	5	13	0	76	4	19	1
K4b	70	3	25	2				
K5a	81	0	19	0	81	1,5	17,5	0
K5b	81	3	16	0				
MW					74,2	1,5	21,7	2,6

0,5 mg Ü 30

Einzelwerte Üa, Üb					MW von Üa + Üb			
	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M
Ü1a	52	4	34	10	46	2,5	41,5	10
Ü1b	40	1	49	10				
Ü2a	66	1	25	8	64,5	0,5	24,5	10,5
Ü2b	63	0	24	13				
Ü3a	73	2	20	5	74	5,5	17	3,5
Ü3b	75	9	14	2				
Ü4a	79	3	11	7	78,5	3,5	10,5	7,5
Ü4b	78	4	10	8				
MW					65,75	3	23,375	7,875

Tabelle 12: Differentialblutbilder der einzelnen Mäuse Versuch IV

K = Kontrollmäuse
Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
1-5 = Nummer des Tieres
a = Differentialblutbild a
b = Differentialblutbild b

MW = Mittelwert aus den Differentialblutbildern a + b, bzw. aus den Differentialblutbildern aller Tiere des Versuchs IV
L = Lymphozyten
Ke = Kernschatten
G = Granulozyten
M = Monozyten

	1,0 mg Ü 30								2,0 mg Ü 30							
	Einzelwerte Üa,Üb				MW von Üa+Üb				Einzelwerte Üa Üb				MW von Üa+Üb			
	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M	L	Ke	G	M
Ü1a	Leukozyten zu blaß, nicht								60	0	34	6	73	3	20,5	3,5
Ü1b	differenzierbar								86	6	7	1				
Ü2a	89	0	5	6	78,5	0	15	6,5	59	0	34	7	60	1	33,5	5,5
Ü2b	68	0	25	7					61	2	33	4				
Ü3a	67	0	28	5	64	1	29	6	51	3	40	6	53,5	6	33	7,5
Ü3b	61	2	30	7					56	9	26	9				
Ü4a	78	1	15	6	77,5	4	11,5	7	74	6	16	4	76	4	15,5	4,5
Ü4b	77	7	8	8					78	2	15	5				
MW					73,3	1,7	18,5	6,5					65,6	3,5	25,6	5,3

Tabelle 13: Differentialblutbilder der einzelnen Mäuse Versuch IV

Ü = Mäuse, die mit dem teilweise gereinigten Kalbsmilzextrakt Ü30 behandelt wurden
1-4 = Nummer des Tieres
a = Differentialblutbild a
b = Differentialblutbild b
MW = Mittelwert aus den Differentialblutbildern a + b, bzw. aus den Differentialblutbildern aller Tiere des Versuchs IV

L = Lymphozyten
Ke = Kernschatten
G = Granulozyten
M = Monozyten

	Lympho-zyten %	Kern-schatten %	Granulo-zyten %	Mono-zyten %
Kontrollen	76,9	2,3	19,1	1,7
0,5 mg	75,1	2,5	18,3	4,1
1,0 mg	73,6	2,2	17,7	6,4
2,0 mg	68,2	3,9	23,0	4,9

Tabelle 14: Ergebnisse der Auszählung der Differentialblutbilder: Mittelwerte der Versuche II bis IV

	Kontrollen		0,5 mg Ü30		1,0 mg Ü30		2,0 mg Ü30	
	LR %	NLR %	LR %	NLR %	LR %	NLR %	LR %	NLR %
II	75,25	24,75	87,1	12,9				
III	85,8	14,2	74,6	25,4	76,5	23,5	75,1	24,9
IV	75,7	24,3	68,75	31,25	75,0	25,0	69,1	30,9
MW	78,9	21,1	77,3	22,7	75,8	24,2	71,9	28,1

Tabelle 15: Differentialblutbilder: Verteilung der Zellen auf die lymphatische (LR), und die nicht lymphatische (NLR) Reihe.

II-IV = Versuchsnummer
MW = Mittelwert der Versuche II-IV

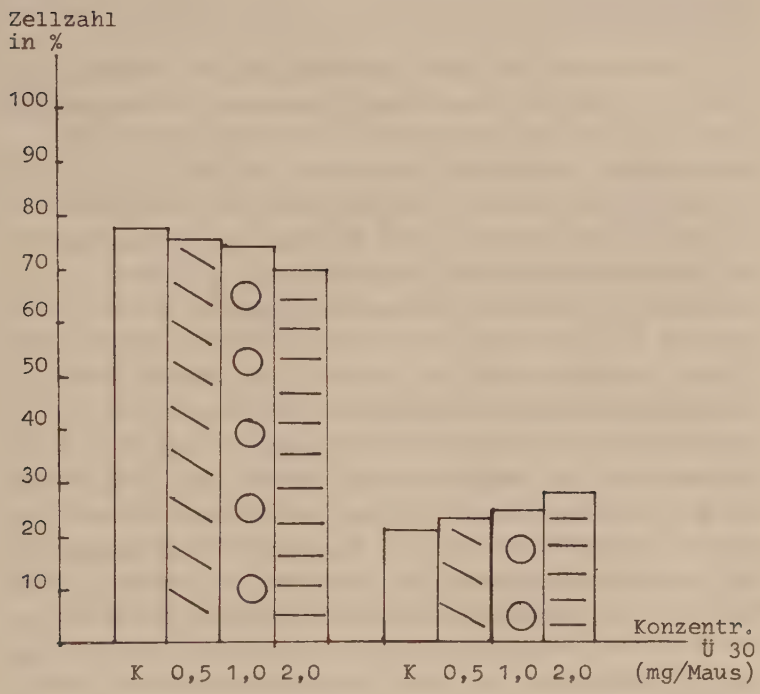

Abb. 7: Differentialblutbilder
Verteilung der Zellen auf die lymphatische und die nicht lymphatische Reihe.

K = Kontrollen (n=15)

0,5 = 0,5 mg Ü 30/Maus (n=13)

1,0 = 1,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

2,0 = 2,0 mg Ü 30/Maus (n=8)

4. Diskussion

Zur Untersuchung des membrangereinigten Inhibitors in vivo wurden AKR-Mäuse verwendet, da diese, hervorgerufen durch ein schon bei der Geburt vorhandenes RNA-Virus, "spontan" ein AK-Lymphom entwickeln (28,29).
Mc. Endy, Boon und Furth konnten schon im Jahre 1944 zeigen, daß dem Thymus in der Entwicklung der Leukämie bei einem Mäusestamm mit hoher Frequenz spontaner lymphatischer Leukämie eine große Bedeutung zukommt (9).
Nakakuki et al. zeigten, daß Tiere, denen im Alter von 3 Tagen der Thymus entfernt wurde, kein Lymphom entwickelten, während von denjenigen, bei denen die Thymektomie mit 180 Tagen durchgeführt wurde, 17 %, und bei den Kontrolltieren 76 % ein Lymphom entwickelten (29).
Mit der Transplantation von Thymuszellen erkrankter Mäuse sollte erreicht werden, daß sich die Leukämiezellen bei allen Versuchstieren zur gleichen Zeit in der selben Phase der Vermehrung befinden. Die spontane Leukämie ist zum Zeitpunkt der Diagnose in einer Sättigungsphase, in der es schwieriger ist, eine DNS-Synthese-Hemmung nachzuweisen.

E. Heidemann et al. hatten festgestellt, daß die Hemmung des 3H-TdR-Einbaus bei den MKT-CH-Zellen, die eine Zyklusdauer von 27 Stunden haben, frühestens nach 8 Stunden auftrat, und daß nach 72 Stunden (knapp drei Zyklen), keine Beeinträchtigung des Thymidineinbaus mehr festzustellen war (12).
Auch D. Hennings et al. konnten 1,5 und 5 Stunden nach der Injektion eines wässrigen Hautextraktes kaum eine Hemmung der DNS-Synthese beobachten, während sie 9,5 und 13,5 Stunden später eine deutliche Hemmung verzeichnen konnten.
Wir arbeiteten die Mäuse ca. 24 Stunden nach der Injektion

des $Ü_{30}$ und des 3H-TdR auf. Diese Zeitspanne dürfte aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse von E. Heidemann et al., sowie D. Hennings et al. so liegen, daß der Nachweis einer Hemmung möglich sein müßte.

Für unsere Versuche verwendeten wir nur weibliche Tiere. Dafür sprach die Tatsache, daß diese weniger aggressiv als männliche sind, was den Vorteil hat, daß sie sich nicht in ständigem Stress befinden und es dadurch auch nicht zu einem Überlagerungseffekt durch Stresshormone kommt.
Nachdem Chung und Hufnagel bei i.p. Verabreichung von 300 ug eines teilweise gereinigten Schweinelymphknotenextraktes (MG 30000-50000) über 5 Tage eine statistisch signifikante Hemmung des Thymuswachstums bei neugeborenen Kaninchen (24-36 h) feststellen konnten, schienen die von uns gewählten Konzentrationen in Höhe von 0,5, 1,0 und 2,0 mg, für die i.v. Injektion hoch genug gewählt zu sein, um eine Wirkung erzielen zu können (7). Dies bestätigte sich dann auch in Vorversuchen.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, hemmte der teilweise gereinigte Kalbsmilzextrakt $Ü_{30}$ den 3H-TdR-Einbau in die inguinalen Lymphknoten in allen eingesetzten Konzentrationen nicht signifikant (Abb.1).
Auch die Zellproliferation in den paraaortalen Lymphknoten zeigt bei allen Konzentrationen keine signifikante Hemmung (Tab. 2, Abb. 2).
F. Wörz konnte dagegen mit dieser Dosis desselben Extraktes eine signifikante Hemmung des 3H-TdR-Einbaus in die Thymuszellen feststellen (33).
Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß bei der transplantierten AKR-Leukämie (s.S. 3) die Proliferation der transplantierten Zellen zunächst vorwiegend im Thymus stattfindet, in den Lymphknoten dagegen die Leukämie-

zellen wesentlich später erscheinen (s.S.5). Dies entspräche der Entwicklung der spontanen AKR-Leukämie, die von Skipper et al. ausführlich untersucht wurde (29).

Bei Untersuchungen an Melanomzellen (Mel-Ei-78) und Ehrlich-Aszites-Zellen haben E. Heidemann et al. festgestellt, daß in diesen, nicht zum lymphatischen System gehörenden Zellen, durch $Ü_{30}$ keine Beeinflussung des Kernstoffwechsels stattfand, der Milzextrakt also gewebespezifisch hemmt (12).
Um die Gewebespezifität in vivo nachzuweisen, untersuchten wir die Wirkung des Extraktes auf Jejunum, Ileum und die Epidermis. Da es technisch nicht möglich war, das Dünndarmepithel vom Darm zu trennen, mußte damit gerechnet werden, daß bei der Untersuchung des Jejunums eventuell eine geringe Hemmung resulieren würde, da in den Solitärfollikeln, die auch hier vorkommen, eine Hemmung durch den Extrakt auftreten könnte. Jedoch dürfte die Proliferation des Epithels dominieren und daher der TdR-Einbau im Darm repräsentativ für die Epithelproliferation sein.
Bei der Untersuchung des Ileums wäre eventuell eine Hemmung des 3H-TdR-Einbaus möglich gewesen, da hier in der Schleimhaut Lymphfollikel in großen Ansammlungen als Folliculi lymphatici aggregati, PEYER'sche Plaques, zu finden sind.
Die Ergebnisse in Tab. 4 und Abb. 4 zeigen jedoch, daß auch hier keine signifikante Hemmung stattgefunden hat. Die Ergebnisse in Tab. 3 zeigen bei Versuch II und III keine signifikante Hemmung des 3H-TdR-Einbaus in das Jejunum. Bei Versuch IV ist eine große Streuung festzustellen, wie das oft bei Tierversuchen der Fall ist. Auch dieser Versuch zeigt keinen Hinweis für eine Proliferationshemmung in Dünndarm oder Epidermis.

Die Epidermis wählten wir, weil es sich bei ihr um ein relativ rasch proliferierendes Gewebe handelt - im Stratum germinativum der Ratte werden täglich 5,2 % der Zellen neu gebildet - an dem eine eventuelle Hemmung festgestellt werden könnte (5).
Bei der Präparation der Cutis war es nicht möglich, die Epidermis vom Corium zu trennen. Sie erreicht beim Menschen eine Dicke von 0,04 - 0,23 mm in der Hohlhand und auf der Fußsohle normalerweise 0,75 - 1,2 mm, (an Schwielen 2 mm) und ist bei Mäusen noch dünner.
Da die Proliferation der Epidermis weit überwiegt, kann der TdR-Einbau als repräsentativ für diese angesehen werden.
Die Ergebnisse zeigen bei allen Konzentrationen eine nicht signifikante Hemmung.

Die Abnahme des Blutes für die Differentialblutbilder machte im Gegensatz zur Abnahme für die Leukozytenzählung keinerlei Schwierigkeiten. Die ausreichende Blutmenge für die Zählung der Leukozyten war manchmal nur unter großen Schwierigkeiten zu erhalten. Dazu mußte der Schwanz kräftig zur Schwanzspitze hin ausgestrichen werden.
Schäfer beobachtete, daß die absolute Zahl der Leukozyten bei Mäusen infolge biologischer Rhythmen, eventuell auch durch die Blutentnahmetechnik bedingt, eine große Schwankungsbreite zeigt (8).
Auch in unseren Versuchen zeigte sich eine breite Streuung der Leukozytenwerte, die nicht erlaubt, aus Einzelwerten Schlüsse zu ziehen. Inwieweit die fehlende Signifikanz der Beeinflussung der peripheren Lymphozytenzahl durch $\ddot{U}_{30}$ auf die Variationsbreite der Leukozyten zurückzuführen ist, muß offen bleiben.
Da wir keine signifikante Hemmung der Epidermis- und Dünndarmproliferation feststellen konnten, andererseits

aber eine signifikante Hemmung der Thymuszellproliferation von Wörz in einer parallel durchgeführten Arbeit gefunden wurde, erfüllt der von uns verwendete Kalbsmilzextrakt $Ü_{30}$ die Kriterien für ein Lymphozytenchalon auch in vivo.

5. Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes $Ü_{30}$ (Lymphozytenchalon) an AKR-Mäusen in vivo getestet.
Wir führten 4 Versuche mit insgesamt 53 ca. 6-8 Wochen alten Tieren durch, denen 1-2 x 10^6 Zellen vom Thymus einer AKR-Maus mit manifester lymphatischer Leukämie i.v. injiziert wurden.
Etwa 48 Stunden nach der Inokulation der Thymuszellen wurden $Ü_{30}$ i.v. und 3H-Thymidin i.p. gespritzt.
Die Untersuchung der Wirkung von $Ü_{30}$ auf die inguinalen und paraaortalen Lymphknoten ergab bei allen Konzentrationen eine Hemmung des 3H-Thymidineinbaus, die jedoch nicht signifikant war (Tab. 1 und 2, Abb. 1 und 2).
Bei der Leukozytenzählung gelang es nicht, von allen Tieren einen Wert zu erhalten, so daß die Ergebnisse nur bedingt zu verwerten sind (Tab. 8, Abb. 6). Es zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung unter dem Einfluß von $Ü_{30}$.
Die Auswertung der Differentialblutbilder ergab eine geringe konzentrationsabhängige, jedoch nicht signifikante Reduktion der Zellen der lymphatischen Reihe (Tab. 9-15, Abb. 7) nach Injektion von $Ü_{30}$.
Bei der Untersuchung der Epidermis und Dünndarmproliferation konnten wir keine signifikante Hemmung verzeichnen (Tab. 3-7, Abb. 3-5).
In einer parallel durchgeführten Arbeit konnte Wörz mit derselben Dosis dieses Extraktes eine signifikante Hemmung der Thymuszellproliferation feststellen, so daß der von uns verwendete Kalbsmilzextrakt $Ü_{30}$ in Zusammensicht der Ergebnisse von Wörz und dieser Untersuchung die Kriterien für ein Lymphocytenchalon in vivo erfüllt.

Literaturverzeichnis

1. Bateman, A.E. : Cell specifity of chalone-type inhibitors of DNA synthesis releases by blood leukocytes and erytrocytes.
Cell Tiss. Kinet 7, 451-461 (1974)

2. Bjerknes, R. and Iversen, O.H. : "Antichalone". A theoretical treatment of the possible role of chalone in the growth control system.
Acta path. microbiol. scand. Sect. A. Sup. 4, 33-42 (1974)

3. Bruce, W.R., Meeker, B.E., Powers, W.E. and Valeriote, F.A. : Comparison of the dose-and time- survivals curves für normal hematopoietic and lymphoma colony- forming cells exposed to vinblastine, vincristine, arabinosylcytosine and amethopterin
J. of the National Cancer Inst. Vol 42
1015-1025 (1969)

4. Bruce, W.R., Valeriote, F.A. and Meeker, B.E. : Survival of mice bearing a transplanted syngeneic lymphoma following treatment with cyclophosphamide 5 - fluoruracil, or 1,3 - bis (2 chlorethyl) - 1 - mitroso urea
J. of the National Cancer Inst. 39, 257-266 (1967)

5. Bucher, O. : Cytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen, 7. Auflage 1970, Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien.

6. Bullough, W.S., Laurence, E.B. : The control of epidermal mititic activity in the mouse
Proc. roy. Soc. B 151, 517-536 (1960)

7. Chung, A.C., Hufnagel, C.A. : Some in vivo effects of chalone (mitotic inhibitor) obtained from lymphoid tissues
Nat. Cancer Inst. Monogr. 38, 131-134 (1975)

8. Cohrs, P., Jaffe, R., Meesen, H. : Pathologie der Laboratoriumstiere
Springer Berlin, Göttingen, Heidelberg (1958)

9. Mc Endy, D.P., Boon, M.C. and Furth, J. : On the role of thymus, spleen and gonads in thedevelopment of leukemia in a high-leukemia stock of mice
Cancer Research, Volume 4, 377-383 (1944)

10. Garcia-Giralt, E., Diaz-Rubio, E. and Rappaport, H. : Evaluation of the specificity of a lymphoid chalone
Cell Tissue Kinet. 8, 589-592 (1975)

11. Garcia-Giralt, E., Morales, V.H., Lasalvia, E. and Mathe, G. : Suppression of graft vesus host reaction by a spleen extract
I. Immunol. 109, 878 (1972)

12. Heidemann, E., Jung, A., Wilms, K. : Gewebsspezifische Hemmung der Lymphocytenproliferation durch Milzextrakt (Lymphocytenchalon)
Klin. Wschr. 54, 221-226 (1976)

13. Hennings, H., Elgjo, K. and Iversen, O.H. : Delayed inhibition of epidermal DNA synthesis after injektion of an aqueous skin extract (chalone)
Virch. Arch. 4, 45-53 (1969)

14. Houck, I.C. : Chalones, North-Holland publishing Company Amsterdam-Oxford / American Elsevier publishing Company New York (1976)

15. Houck, I.C., Hennings, H. : Chalones specific endogenous mitotic inhibitors
Febs Letters, Volume 32, 1-8 (1973)

16. Houck, I.C., Irausquin, H. : Somme properties of the lymphocyte chalone
Nat. Cancer Inst. Monogr. 38, 117-122 (1973)

17. Jones, I., Paraskova-Tchernozenska, E. and Moorhead, I. : In vitro inhibition of DNA synthesis in human leukemic cells by a lymphoid cell extract
Lancet, March 28, 654 (1970)

18. Jung, S. : Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere
Stuttgart: Gustav Fischer 1962

19. Lasalviy, E., Garcia-Giralt, E. and Macieira-Coelho,A : Extraction of an inhibitor of DNA synthesis from human peripheral blood lymphocytes and bovine spleen
Europ. I. clin. biol. Res. 15, 789 (1970)

20. Metcalf, D., Wiadrowski, M. : Antoradiographic analysis of lymphocyte proliferation in the thymus and in thymic lymphoma tissue
Cancer Research 26, 483-491 (1966)

21. Moorhead, I.F., Paraskova-Tchernozenska, E., Pirrie, A.I. and Hayes, C. : Lymphoid inhibitor of human lymphocyte DNA synthesis and mitosis in vitro
Nature 224, 1207 (1968)

22. Morales, V.H. and Garcia-Giralt, E. : Immunosuppressive action in vitro by a bovine spleen extract
Z. Naturforschung 26 b, 1339-1340 (1971)

23. Omine, M., Perry, S. : Use of cell separation at 1 g for cytokinetic studies in spontaneous AKR leukemia
I. Nat. Cancer Inst. 48, 697-704 (1972)

24. Rosen, P.J., Perry, S. and Schabel, F.M.Jr. : Proliferative capacity of leukemic cells in AKR leukemia
J. Nat. Cancer Inst. 45, 1169-1177 (1970)

25. Rytömaa, T. and Kiviniemi, K. : Control of granulocyte production I. chalone and antichalone, two specific humoral regulators
Cell Tissue Kinst. 1, 329-340 (1968)

26. Schabel, F.M.Jr., Skipper, H.E., Trader, M.W., Laster, W.R.Jr. and Simpson-Herren, L. : Spontaneous AK leukemia (lamphoma) as a model system
Cancer Chemother. Rep. 53, 329-344 (1969)

27. Simpson-Herren, L. and Lloyd, H.H. : Kinetic parameters and growth curves for experimental tumor systems
Cancer Chemother. Rep. 54, 143-174 (1970)

28. Skipper, H.E., Schabel, F.M.Jr., Trader, M.W. and Laster, W.R.Jr. : Response to therapie of spontaneous first passage and long passage lines of AK-Leukemia
Cancer Chemother. Rep. 53, 345-366 (1969)

29. Skipper, H.E., Schaben, F.M.Jr., Trader, M.W., Laster, W.R.Jr., Simpson-Herren, L. and Lloyd, H.H. : Basic and therapeutic trial results obtaines in the spontaneous leukemia (lymphoma) model - end of 1971
Cancer Chemother. Rep. 56, 273-295 (1972)

30. Weiss, P., Kaveanau, I.L. : A model of growth and growth control in mathematical terms
I. Gen. Physiol. 41, 1-47 (1957)

31. Wilk, W. : Anforderungen an die Haltung von Versuchstieren. In : Grundinformationen über Versuchstierfragen. Kommission für Versuchstierforschung
Mitteilung 1, 29-37 (1971)

32. Winne, D. : Zur Auswertung von Versuchsergebnissen : Die verteilungsfreien Rangteste von Wilcoxon.
Arzneimittelforschung 14, 119-120 (1964)

33. Wörz, F. : Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalon) auf lymphatische Zellen in vivo
Dissertation - Fachbereich Klinische Medizin der Universität Tübingen

Lebenslauf

Am 9.12.1947 wurde ich, Hans Ganser, als Sohn des Johannes Ganser und der Frida Ganser, geborene Lude, in Schopfloch geboren. Von 1954-1962 besuchte ich die Volksschule in Schopfloch, Kreis Esslingen. Es folgten eine landwirtschaftliche Lehre und die Tätigkeit auf dem elterlichen landwirtschaftlichen Betrieb bis 1968. 1968/1969 schloß sich der Besuch der Berufsaufbauschule in Nürtingen und daran anschließend der Besuch des Staatlichen Instituts zur Erlangung der Hochschulreife in Stuttgart mit Ablegung des Abiturs 1972 an.

Im Wintersemester 1972 / 73 begann ich das Medizinstudium in Tübingen. Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im März 1975 ab, den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung 1976 und den zweiten Teil 1978. Mit Abschluß des dritten Teils der Ärztlichen Prüfung am 3. Mai 1979 beendete ich mein Medizinstudium.

Der experimentelle Teil der vorliegenden Untersuchungen fiel in die Jahre 1976/1977.

Seit Mai 1978 bin ich mit der Lehrerin Ingrid Ganser, geborene Fischer, aus Urach verheiratet.